



УДК 619:616.99:636.92

В.А. ЛЕВИЦЬКА, аспірант

Сумський національний аграрний університет

А.В. БЕРЕЗОВСЬКИЙ, докт. ветеринарних наук, професор

Науково-виробнича фірма «Бровафарма», м. Бровари Київської області

ДІАГНОСТИКА ЕНЦЕФАЛІТОЗООНОЗУ КРОЛІВ МЕТОДОМ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Подано результати отриманих методом ІФА тестів, на підставі яких вперше в Україні було встановлено заключний діагноз – енцефалітозооноз кролів. При цьому екстенсивність інвазії серед поголів'я неблагополучних кролегосподарств становить 44,32 %.

Енцефалітозооноз – зооантропонозна інвазія, переважно кролів, яку спричинює мікроскопічний облігатний внутрішньоклітинний паразит *Encerphalitozoon cuniculi*, що належить до мікроспоридій. Він уражає центральну нервову систему (головний і спинний мозок), а також нирки, печінку, селезінку, серце, легені та очі. У зовнішнє середовище виділяється лише з сечею хворих тварин [8].

Основний хазяїн для *E. cuniculi* – кроль. У популяції домашніх кролів рівень поширення, як правило, високий – 37–68% [13]. Наявні повідомлення свідчать, що *E. cuniculi* виявляють на всіх континентах у зонах з розвинутим кролівництвом. У популяціях диких кролів паразит поширений менше, що, ймовірно, можна пояснити меншою щільністю тварин цього виду [17].

Крім гострої форми, енцефалітозооноз може мати хронічну й латентну форму, без видимих клінічних ознак, що на практиці дуже ускладнює виявлення й діагностику цієї хвороби [9]. Водночас дехто з дослідників вказує на високий рівень безсимптомно хворих тварин, а це, в свою чергу, унеможливає вибракування таких кролів за клінічними ознаками.

При встановленні діагнозу враховують клінічні ознаки хвороби, епізоотологічні дані, патолого-анатомічні зміни та результати лабораторно-діагностичних тестів. Кінцевий діагноз на енцефалітозооноз встановлюється комплексно з використанням гістоло-

гічних досліджень нирок і головного мозку, імуногістохімічних досліджень, методів хромотропного фарбування, імунофлуоресценції або хемофлуоресценції, електронної мікроскопії. Використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), можна досліджувати спинномозкову рідину, тканини, сечу, фекальні маси кролів [15]. Проте таке дослідження надто трудомістке й забирає багато часу, тому наряд чи широко використовуватиметься на практиці.

Сьогодні, на думку багатьох учених, серологія – найважливіший метод для діагностики *E. cuniculi* у живих тварин. Непрямий метод флуоресцентних антитіл (IFAT) та методи імуноферментного аналізу (ІФА, ELISA) є найпоширенішими тестами, і вони добре корелюють один з одним.

Останнім часом значної популярності набуває метод ІФА. Висока специфічність, чутливість і доступність дозволяють широко використовувати його в складних умовах для встановлення діагнозу в гуманній і ветеринарній медицині [3].

У Словаччині й Німеччині завдяки застосуванню цього методу було встановлено, що близько 42% домашніх кролів серопозитивні [11, 12]. За повідомленнями, в Голландії цей показник наближається до 52% [16]. Ще вищий відсоток серопозитивних кролів виявлено в Італії й Австрії – 66,7 і 78,3% відповідно [10, 14].

До недавнього часу в Україні не

було офіційно зареєстровано проявів енцефалітозоонозу кролів. Проте наші практичні спостереження свідчать про наявність цієї зооантропонозної інвазії принаймні в двох областях – Хмельницькій і Чернівецькій. За результатами вивчення поширення енцефалітозоонозу кролів і встановлення характерних клінічних ознак ми опублікували 5 наукових праць [1, 2, 4–6]. Ураховуючи досвід спеціалістів з країн Євросоюзу щодо імуноферментної діагностики енцефалітозоонозу, ми також вирішили застосувати цей тест для підтвердження заключного діагнозу, що становить великий інтерес для вивчення поширення хвороби та її діагностики.

Мета дослідження – апробація методу ІФА для виявлення специфічних антитіл у кролів при енцефалітозоонозі, спричиненому *E. cuniculi*.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Предметом досліджень була сироватка крові кролів із трьох неблагополучних господарств Хмельницької й Чернівецької областей, у яких періодично спостерігали клінічні ознаки енцефалітозоонозу. Первинний діагноз базувався на гістологічних дослідженнях нирок, головного мозку та мікроскопії фарбованих мазків сечі.





Кров відбирали у різновікових кролів із крайової вени вуха. Скляні пробірки з пробами крові поміщали в термостат за температури 37°C для відстоювання впродовж години. Відтак їх центрифугували при 2000 об./хв. Отриману сироватку крові поміщали в мікропробірки типу «Епендорф» об'ємом 1,5 мл і заморожували в морозильній камері побутового холодильника при температурі -18°C. Надалі зразки сироватки транспортували в замороженому стані.

Дослідження проводили в науково-дослідному відділі імунологічних досліджень Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (м. Київ). Використовували тест-систему *Encephalitozoon cuniculi* (EC) ELISA виробництва фірми Medicago AB (Швеція). Відповідно до повідомлення виробника цей тест дає можливість виявити антитіла до збудника енцефалітозоозу (*E. cuniculi*) в сироватці крові кролів, що, в свою чергу, є свідченням наявності гострої або латентної інвазії.

Перед початком дослідження сироватку було розморожено. На планшет з антигенним покриттям спочатку було нанесено в розведеннях негативні тест-сироватки (лунки A1, B1, A2, B2) та позитивні (лунки C1, D1, C2, D2) по 100 мкл. У решту лунок було внесено діагностичні проби сироваток по 100 мкл. Далі планшети залишали для інкубації при кімнатній температурі на 60 хв. Потім їх тричі промивали у вошері й вносили в лунки по 100 мкл кон'югату. Знову залишали на інкубацію при кімнатній температурі на 30 хв. Відтак планшети знову тричі промивали у вошері. Далі вносили в лунки

100 мкл субстратної суміші, яку залишали для інкубації ще на 15 хв у темному місці для повного розвитку забарвлення. Після цього в кожну лунку внесли 50 мкл стоп-розчину для зупинки реакції. Далі планшет поміщали у спеціальний імуоферментний аналізатор Tecan Sunrise, де заміряли й зчитували оптичну щільність зразків і контрольних проб при довжині хвилі 450 нм.

Сироватку крові було протестовано в розведенні 1:40. ІФА вважається позитивною на антитіла до *E. cuniculi*, якщо оптична щільність (ОЩ) зразків рівна або перевищує значення 3, і негативною – якщо ОЩ менша від 3. При цьому зразки з високою ОЩ забарвлюються в жовтий колір, інтенсивність якого наростає пропорційно до збільшення ОЩ (див. рисунок).

На одному планшеті можна дослідити 44 проби сироватки. Кожна тест-система містить два таких планшети.

Статистично результати ІФА обробляли за І.А. Ойвінім [7].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами аналізу зразків крові від 88 кролів та розрахунками було встановлено, що з усіх досліджених проб сироватки 39 були позитивними. Це свідчить про те, що інтенсивність інвазії, визначеної за методом ІФА, становила 44,32 %.

У групі негативно реагуючих тварин показники оптичної щільності антитіл коливаються в межах 0,67–2,88 одиниці, тоді як у групі позитивно реагуючих – 3,0–400,0.

При подальшому аналізі отриманих показників було розкрито широкі варіації імунних відповідей (див. та-

блицю). Виходячи з варіантів визначення ступеня інвазії, наявних в інформативних повідомленнях із країн ЄС, отримані результати ІФА можна трансформувати в такі 5 груп:

- негативно реагуючі (значення ОЩ до 3);
- серопозитивні з низьким титром антитіл (ОЩ 3–9);
- серопозитивні з середнім титром антитіл (ОЩ 10–99);
- серопозитивні з високим титром антитіл (ОЩ 100–300);
- серопозитивні з високим титром антитіл і клінічними проявами (ОЩ понад 300).

З наведених даних зрозуміло, що в пробах сироватки від 49 тварин результат був негативним, при цьому концентрація антитіл була низькою й показник оптичної щільності антитіл становив у середньому $1,99 \pm 0,09$. Мінімальне значення ОЩ антитіл у цій групі дорівнювало 0,67, а максимальне – 2,88.

У пробах сироватки крові від 19 тварин спостерігали низький титр антитіл, який коливався в межах 3–8,5 одиниці ОЩ антитіл, а середнє значення ОЩ становило $4,36 \pm 0,33$.

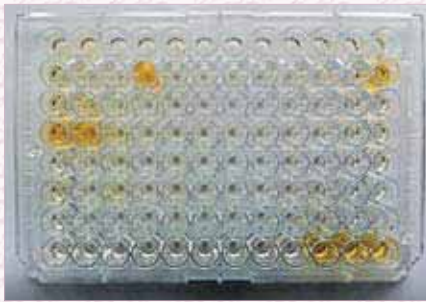
Десять тварин мали середній рівень антитіл – середнє значення ОЩ становило $16,65 \pm 2,05$, а граничні показники були в межах від 10,5 до 28,75 одиниці.

У 6 серопозитивних тварин виявили досить високі титри антитіл при відсутності будь-яких клінічних ознак. При цьому середнє значення ОЩ становило $174,98 \pm 21,61$ зі значними коливаннями показників від мінімального (103,88) до максимального значення (232,0).

У п'ятій групі тварин (серопозитивні з високим титром антитіл та

Таблиця – Показники варіацій імунної відповіді тварин за результатами ІФА, $P < 0,001$

Групи тварин за результатами ІФА	Кількість тварин, n	Середній показник ОЩ антитіл, M±m	Граничні показники ОЩ антитіл, Lim
Негативно реагуючі	49	$1,99 \pm 0,09$	0,67–2,88
Серопозитивні з низьким титром антитіл	19	$4,36 \pm 0,33$	3,00–8,50
Серопозитивні з середнім титром антитіл	10	$16,65 \pm 2,05$	10,50–28,75
Серопозитивні з високим титром антитіл	6	$174,98 \pm 21,61$	103,88–232,0
Серопозитивні з високим титром антитіл та клінічними ознаками	4	$393,50 \pm 4,29$	381,00–400,0



Планшет із тест-системи Encephalitozoon cuniculi (EC) ELISA після встановлення інтенсивності інвазії методом ИФА

клінічними ознаками), які мали характерні для енцефалозоозу клінічні ознаки, титр антитіл був максимальним – середнє значення його становило $393,50 \pm 4,29$, а ОЩ антитіл коливалась у межах 381–400 одиниць.

Ймовірно, клінічне захворювання з яскраво вираженими неврологічними симптомами супроводжується тривкими високими титрами антитіл, що наближаються до значення 400 (ОЩ). Низькі й середні рівні антитіл можуть свідчити про контакт тварини зі збудником і приховане паразитоносійство. Можна висунути гіпотезу про те, що високі рівні антитіл свідчать про перехід організму зі стану паразитоносійства у стан розвитку хвороби з наступними проявами клінічних ознак, характерних для енцефалітозоозу. При цьому імунна відповідь організму тварини залежить від рівня впливу збудника, про що свідчать значні коливання титрів антитіл.

ВИСНОВКИ

1. На основі результатів, отриманих методом імуноферментного аналізу, вперше в Україні поставлено ключовий діагноз на енцефалітозооз кролів. При цьому екстенсивність зазначеної інвазії серед кролів неблагополучних господарств становила 44,32%.

2. Серед позитивно реагуючих тварин за ступенем титрів виокремлено три рівні антитіл: низький ($4,36 \pm 0,33$), середній ($16,65 \pm 2,05$) та високий ($174,98 \pm 21,61$). Найвищий рівень ($393,50 \pm 4,29$ ОЩ) діагностували в клінічно хворих кролів.

Перспектива досліджень. Визначити чутливість збудника до антимікробних речовин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Березовський А.В.** Деякі аспекти вивчення епізоотології енцефалозоозу домашніх кролів в Подільському регіоні / А.В. Березовський, В.А. Левицька // Науковий вісник Сумського НАУ. – 2012. – Вип. 2 (31). – С. 14–17.
2. **Березовський А.В.** Енцефалозооз домашніх кролів / А.В. Березовський, В.А. Левицька // Ветеринарна медицина України. – 2012. – № 4. – С. 26–28.
3. **Егоров А.М.** Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. – М.: Высшая школа, 1991. – 288 с.
4. **Левицькая В.А.** Выявление энцефалозооза при исследовании смешанных эймериозов кролей в зоне Подолья / В.А. Левицькая // Материалы XI Междунар. конф. молодых ученых «Инновации в ветеринарной медицине, биологии, зоотехнии», г. Витебск, 24–25 мая 2012 г. – Витебск: ВГАВМ, 2012. – С. 70–71.
5. **Левицька В.А.** Експериментальне інвазування лабораторних тварин енцефалітозоозом / В.А. Левицька // Матеріали Міжнародного конгресу спеціалістів ветеринарної медицини, 4–5 жовтня 2012 р. – К., 2012. – С. 82–83.
6. **Левицька В.А.** Етіологія, перебіг та діагностика енцефалозоозу кролів / В.А. Левицька, А.В. Березовський // Ветеринарна біотехнологія. – 2013. – Бюл. 22. – С. 164–171.
7. **Ойвин И.А.** Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований / И.А. Ойвин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1960. – № 4. – С. 76–85.
8. **Bauer Ch.** Protozoeninfektionen des Kaninchens / Ch. Bauer // Veterinarmedizinische Parasitologie. – 6 vollst. – Begr. von J. Boch und R. Supperer. – Stuttgart: MVS, 2006. – S. 561–569.
9. **Csokai J.** Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits / J. Csokai, A. Joachim, A. Gruber et al. // Vet. Parasitol. – 2009. – № 163 (1–2). – P. 18–26.
10. **Csokai J.** Infection with Encephalitozoon cuniculi in the rabbit / J. Csokai, F. Künzel // Prakt. Tierarzt. – 2010. – № 10 (91). – P. 854–868.
11. **Ewingmann A.** Untersuchungen zur Klinik und Therapie der Encephalitozoonose bei im Heimtierkani nchen / A. Ewingmann, T. Göbel // Kleintierpraxis. – 1999. – № 44. – S. 357–372.
12. **Halánová M.** Serological screening of occurrence of antibodies to Encephalitozoon cuniculi in humans and animals in Eastern Slovakia / M. Halánová, L. Cisláková, A. Valencáková et al. // Ann. Agric. Environ. Med. – 2003. – № 10 (1). – P. 117–120.
13. **Künzel F.** Encephalitozoonosis in rabbits / F. Künzel, A. Joachim // Parasitology research. – 2010. – № 106 (2). – P. 299–309.
14. **Santaniello A.** Serological survey of Encephalitozoon cuniculi in farm rabbits in Italy / A. Santaniello, L. Dipineto, L. Rinaldi et al. // Res. Vet. Sci. – 2009. – № 87 (1). – P. 67–69.
15. **Valencakova A.** Application of specific primers in the diagnosis of Encephalitozoon / A. Valencakova, P. Balent, F. Novotny, L. Cislakova // Ann. Agric. Environ. Med. – 2005. – № 12. – P. 321–323.
16. **Valencakova A.** Encephalitozoonosis in household pet Nederland Dwarf rabbits (Oryctolagus cuniculus) / A. Valencakova, P. Balent, E. Petrovova et al. // Vet. Parasitol. – 2008. – № 153 (Pt. 3–4). – P. 265–269.
17. **Valencakova A.** Immune response to Encephalitozoon infection review / A. Valencakova, M. Halanova // Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. – 2012. – № 35 (1). – P. 1–7.

Одержано 26.02.2013

Діагностика энцефалитозооза кролей методом иммуноферментного анализа.

В.А. Левицькая, А.В. Березовский

Отражены результаты тестов, полученных методом ИФА, на основании которых впервые в Украине поставлен заключительный диагноз – энцефалитозооз кролей. При этом экстенсивность данной инвазии среди поголовья неблагополучных кролехозяйств составила 44,32%.

Diagnostics of Encephalitozoon in rabbits by methods of enzyme immunoanalysis. V.A. Levitskaya, A.V. Berezovskiy

Displays the test results obtained by ELISA method, on the of it was made final diagnosis on Encephalitozoon in rabbits first in Ukraine. Herewith the extensiveness of invasion of livestock of disadvantaged rabbits households was 44,32%.

